

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif yang mengangkat fenomena alam sebagai salah satu masalah dalam penelitian. Penelitian yang dilakukan mengarah pada hasil menerangkan arti dan kejelasan dari informasi tersebut, yaitu menganalisis hubungan kekerabatan antara individu pisang (*Musa* spp.) dengan merekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan sekuen DNA daerah 5.8S, daerah ITS – 2 dan data gabungan sekuen DNA daerah 5.8S dan ITS – 2.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah 27 organisme pisang (*Musa* spp.) yang diambil dari beberapa daerah Bali (Gianyar, Denpasar, dan Karangasem, Klungkung, Buleleng, dan Jembrana) dan dua sekuen dari individu species *Ensete* spp. Sekuen DNA daerah ITS organisme dari species *Ensete* spp. diperoleh dari *GeneBank* NCBI yang dapat diakses pada halaman web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Tanaman pisang yang digunakan dalam penelitian terdapat pada Tabel 3.1.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari sampai dengan bulan April 2018. Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Genetika, Gedung PAU (Pusat Antar Universitas), dan Laboratorium Genetika SITH, Institut Teknologi Bandung (ITB). Proses sekuensing sampel hasil amplifikasi DNA sekuen daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dari sampel – sampel yang ada dilakukan di Macrogen Inc., Seoul-Korea Selatan.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat di Laboratorium Rekayasa Genetika Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung (Lampiran 1).

Tabel 3.1
Kultivar Pisang (*Musa spp.*) yang Digunakan dalam Penelitian

No.	Species	Nama Daerah (nama kultivar)	Genom	Lokasi Sampling	Keterangan
1.	<i>Musa acuminata</i>	Hias	AAA	Gianyar	Ingroup
2.	<i>Musa x paradisiaca</i>	Sabe Macan	AAB	Klungkung	Ingroup
3.	<i>Musa acuminata</i>	Mas Bali	AA	Gianyar	Ingroup
4.	<i>Musa acuminata</i>	Biu Sangket	AA	Klungkung	Ingroup
5.	<i>Musa acuminata</i>	Biu Keladi	AA	Klungkung	Ingroup
6.	<i>Musa acuminata</i>	Tulang	AAA	Gianyar	Ingroup
7.	<i>Musa x paradisiaca</i>	Tanduk	AAB	Gianyar	Ingroup
8.	<i>Musa x paradisiaca</i>	Kepok Tanjung	ABB	Klungkung	Ingroup
9.	<i>Musa x paradisiaca</i>	Rojo Molo	AAB	Klungkung	Ingroup
10.	<i>Musa acuminata</i>	Raja Buluh	AAA	Gianyar	Ingroup
11.	<i>Musa x paradisiaca</i>	Klopok/Sobo	ABB	Klungkung	Ingroup
12.	<i>Musa acuminata</i>	Biu Buah	AA	Karangasem	Ingroup
13.	<i>Musa acuminata</i>	Ketip Kerta	AAA	Gianyar	Ingroup
14.	<i>Musa x paradisiaca</i>	Biu Poh	ABB	Gianyar	Ingroup
15.	<i>Musa x paradisiaca</i>	Lumut	AAB	Gianyar	Ingroup
16.	<i>Musa acuminata</i>	Mas Marlin	AA	Gianyar	Ingroup
17.	<i>Musa x paradisiaca</i>	Awak	ABB	Gianyar	Ingroup
18.	<i>Musa balbisiana</i>	Klutuk	BB	Denpasar	Ingroup
19.	<i>Musa acuminata</i>	Biu Kaiki	AA	Karangasem	Ingroup
20.	<i>Musa acuminata</i>	Bunga	AA	Karangasem	Ingroup
21.	<i>Musa acuminata</i>	Kole/Sebrina	AA	Gianyar	Ingroup
22.	<i>Musa acuminata</i>	Ketip	AAA	Gianyar	Ingroup
23.	<i>Musa acuminata</i>	Arjuna	AA	Buleleng	Ingroup
24.	<i>Musa x paradisiaca</i>	Bile	AB	Buleleng	Ingroup
25.	<i>Musa acuminata</i>	Terigu	AAA	Jembrana	Ingroup
26.	<i>Musa x paradisiaca</i>	Tanduk	AAB	Jembrana	Ingroup
27.	<i>Musa acuminata</i>	Ketip Sari	AAA	Jembrana	Ingroup
28.	<i>Ensete glaucum</i>	-	-	-	Outgroup
29.	<i>Ensete ventricosum</i>	-	-	-	Outgroup

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian dicuci dan dikeringkan untuk selanjutnya dibungkus dengan menggunakan plastik tahan panas dan disterilisasi

dengan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 1.5 atm selama 10 – 15 menit.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Sampel tumbuhan didapatkan dari beberapa daerah yang diketahui cukup banyak menghasilkan pisang. Daerah – daerah tersebut diantaranya adalah Denpasar, Gianyar, Klungkung, Karangasem, Buleleng, dan Jembrana (Gambar 3.1) . Daerah – daerah tersebut dipilih secara *purposive* berdasarkan informasi yang diperoleh dari Dinas Pertanian lokal serta dari pedagang buah dan penduduk setempat. Sampel yang diambil dari masing – masing individu tumbuhan ini adalah bagian daun muda, disimpan di dalam tabung Falcon dan diberi label identitas sampel. Sampel tumbuhan lalu disimpan di dalam termos yang sudah diisi nitrogen cair dan atau *freezer* pada suhu -20°C untuk menjaga agar tidak terjadi kerusakan pada DNA sampel.



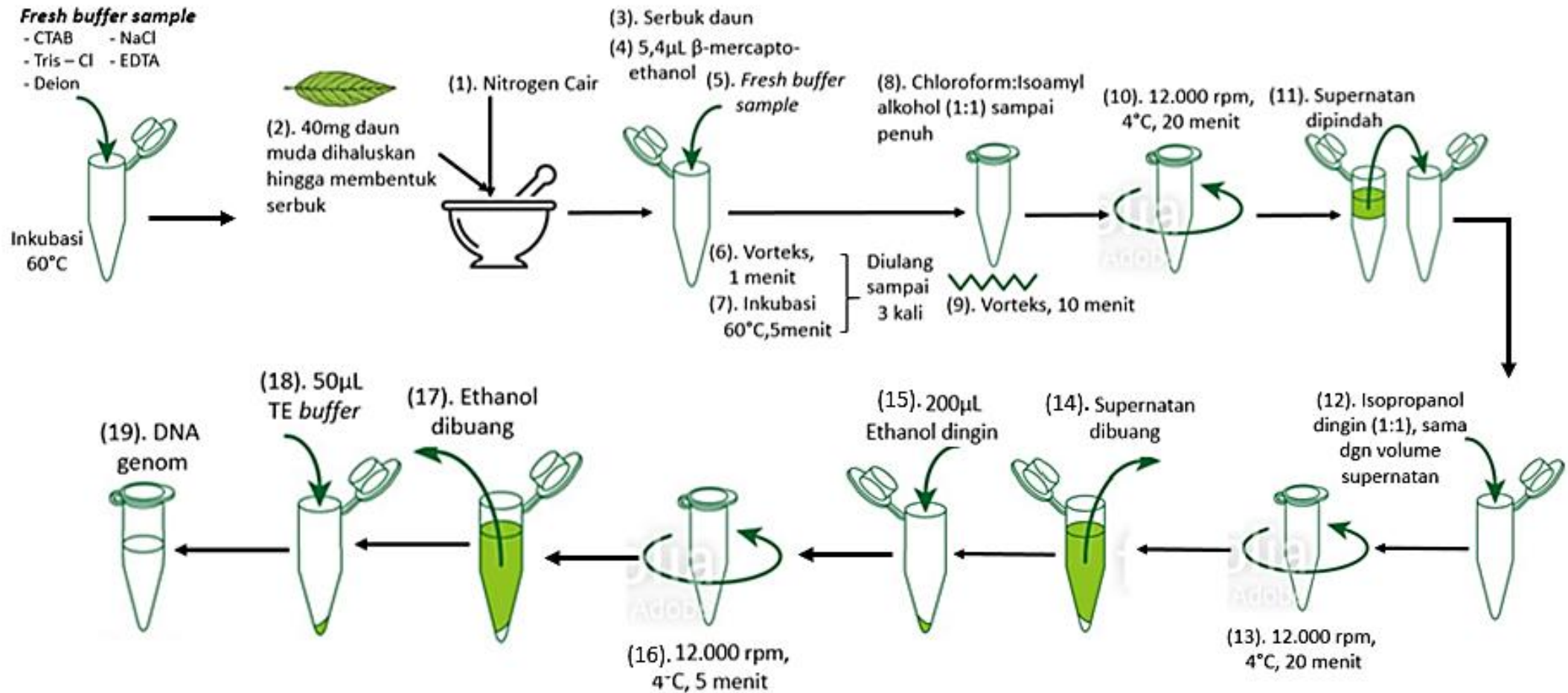
Gambar 3.1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel. Keterangan : (A) Jembrana, (B) Buleleng, (C) Karangasem, (D) Klungkung, (E) Gianyar dan (F) Denpasar.

b. Ekstraksi DNA Genom

DNA dari sampel tanaman yang diambil, diekstraksi menggunakan metode CTAB yang telah sedikit dimodifikasi. Tahapan proses ekstraksi dimulai dengan menyiapkan reagen *fresh buffer sample* dengan komposisi CTAB, Tris-HCl, NaCl, EDTA, dan air deIon ke dalam tabung mikro.

Campuran reagen disimpan atau diinkubasi pada suhu 60°C di dalam *drybath*. Sebanyak 40 mg sampel daun muda dari tanaman pisang dihaluskan menggunakan lumpang dan alu steril sambil sedikit demi sedikit ditambah dengan nitrogen cair hingga daun muda tersebut halus berbentuk serbuk daun.

Serbuk daun yang telah terbentuk kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro yang sudah berisi 5,4 μL β -mercaptoethanol. Reagen *fresh buffer sample* dipindahkan ke dalam tabung mikro yang berisi serbuk daun. Tabung mikro divorteks dengan $\frac{1}{2}$ kecepatan selama 1 menit dengan tujuan menghomogenkan larutan reagen dengan serbuk sampel. Tabung mikro diinkubasi pada suhu 60°C, selama 5 menit. Proses vorteks dan inkubasi diulang sebanyak 3 kali. Setelah diinkubasi, ditambahkan dengan kloroform:isoamyl alkohol (24:1) sampai penuh ($\pm 400\mu\text{L}$). Tabung mikro kemudian divorteks selama 10 menit agar isi tabung menjadi homogen. Tabung mikro selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Suspensi supernatan yang terbentuk selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru. Suspensi supernatan ditambahkan dengan isopropanol dingin dengan perbandingan volume 1:1 (volume isopropanol sebanding dengan volume supernatan yang diambil). Tabung mikro disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit. Suspensi supernatan dibuang dan ditambahkan ethanol 70% sebanyak $\pm 200\mu\text{L}$ lalu disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Larutan ethanol 70% dibuang dan pelet DNA yang terbentuk dikeringkan dengan hati - hati. Setelah kering, pelet DNA yang terbentuk dilarutkan menggunakan larutan *buffer* TE (Tris-HCl dan EDTA) dengan volume 50 μL . Suspensi DNA hasil ekstraksi pada tabung mikro disimpan dalam mesin pendingin atau *freezer* dengan suhu -20°C (Gambar 3.2).



Gambar 3.2. Skema Proses Ekstraksi DNA Genom

c. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi merupakan uji kuantitatif DNA yang dilakukan dengan menggunakan alat Quantus™ Fluorometer dan Nanodrop. Pengukuran ini dilakukan dengan tujuan mengetahui nilai kemurnian dan nilai konsentrasi dari DNA genom hasil ekstraksi. Sebanyak 1µL DNA genom dari masing – masing sampel diukur konsentrasi dan kemurnian DNAny. Sesuai dengan protokol alat yang dikeluarkan oleh Promega, dalam uji kuantifikasi menggunakan alat Quantus™ Fluorometer. Sebelumnya perlu disiapkan beberapa bahan yang dibutuhkan diantaranya adalah larutan buffer TE 1X, larutan *working solution*, *blank sample*, *standar sample*, dan sampel yang akan diuji. Semua pelaksanaan persiapan bahan yang dibutuhkan dilakukan dalam kondisi gelap atau dihindarkan dari cahaya. Penghitungan konsentrasi DNA dilakukan dengan mencampurkan 2µl DNA sampel dengan 200µl of QuantiFluor® dsDNA *Dye working solution*, lalu sampel diuji dengan volume 2µl. Angka yang muncul pada alat merupakan nilai konsentrasi (µg/µl) dari sampel yang diuji.

Proses pengukuran DNA menggunakan alat Nanodrop dilakukan dengan meneteskan 1 µL tepat di atas bulatan *nano drop*. Data hasil penghitungan nilai absorbansi Å260nm dan Å280nm dicatat dan atau disimpan pada komputer untuk selanjutnya dihitung nilai kemurnian dari DNA sampel yang diuji. Sebelum dan sesudah digunakan, alat harus dibersihkan terlebih dahulu menggunakan air deion dan *Nuclease Free Water* (NFW). Nilai perhitungan kemurnian DNA menggunakan alat Nanodrop dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{\text{Å260nm} - \text{Å260nm Blanko}}{\text{Å280nm} - \text{Å280nm Blanko}}$$

Keterangan :

Å260nm = nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang 260 nm

Å280nm = nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang 280 nm

Å260nm blanko = nilai absorbansi blanko pada panjang gelombang 260 nm

Å280nm blanko = nilai absorbansi blanko pada panjang gelombang 280 nm

d. Elektroforesis DNA Hasil Ekstraksi

Proses elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 0,8% dalam buffer TAE 1 X sebagai pelarutnya. Elektroforesis ini bertujuan untuk mengetahui ukuran dan melihat pita DNA hasil visualisasi. Gel agarosa dihomogenkan dengan dididihkan dalam *microwave* selama 1,5 menit hingga campuran terlihat bening dan homogen. Gel agarosa dicetak dengan dituangkan ke dalam cetakan gel yang sudah dipasangkan dengan sisi cetakan dengan posisi tegak. Gel agarosa dibiarkan pada suhu ruang hingga mengeras. Setelah gel agarosa mengeras, sisir sumur dilepaskan dari cetakan secara perlahan agar sumur isian terbentuk dengan baik dan tidak menghancurkan gel agarosa.

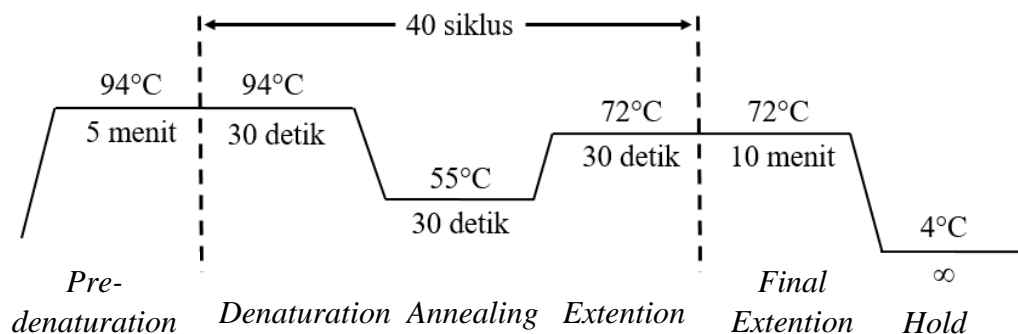
DNA genom hasil ekstraksi dan *ladder* disiapkan dan ditambahkan dengan menggunakan *marker* GelRed, kemudian dimasukkan ke dalam sumur isian gel agarosa yang sudah dipasang pada alat elektroforesis berisi larutan buffer TAE 1 X. Proses *running* elektroforesis dilakukan selama 30 menit dengan menggunakan daya sebesar 100 volt. Gel agarosa hasil elektroforesis lalu diamati menggunakan lampu UV dan didokumentasikan.

e. Amplifikasi sekuen DNA Daerah ITS

Proses amplifikasi sekuen DNA daerah ITS dilakukan menggunakan mesin PCR *Select Cyclor II Thermal Cyclor* – Select BioProduct. Amplifikasi ini bertujuan untuk memperbanyak jumlah ampikon DNA daerah ITS. Proses amplifikasi dilakukan dengan menggunakan satu pasang primer, yaitu ITS-5 (5'-TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAA-3') sebagai primer *forward* dan primer ITS-4 (5'-CCCGCCTGACCTGGGGTCGC-3') sebagai primer *reversed*. Komposisi reagen untuk 1X reaksi amplifikasi sekuen DNA daerah ITS-2 yaitu terdiri dari GoTaq PCR *master mix* sebanyak 25µL dengan konsentrasi 2X; primer ITS-5 dan ITS-4 masing – masing sebanyak 0.5µL dengan konsentrasi 0.1 – 1.0µM; DNA genom sebanyak 5µL dengan konsentrasi akhir <250ng; dan *Nuclease Free Water* (NFW) hingga volume akhir mencapai 50 µL. Pencampuran komponen *master mix* dan sampel DNA genom dilakukan dengan menggunakan tips mikropipet steril atau dengan menggunakan tips *barrier* untuk meminimalisir kemungkinan resiko

terjadinya kontaminasi. Sampel DNA dan komponen *master mix* yang ada di dalam tabung disentrifugasi dengan waktu singkat untuk memastikan campuran semakin homogen.

Tabung Eppendorf berisi sampel dimasukkan ke dalam mesin PCR Select Cyclor II Thermal Cyclor – Select BioProduct. Proses PCR terdiri dari tiga tahap, yaitu denaturasi (*melting*), penempelan primer (*annealing*), dan elongasi (*extention*). Sebelum memasuki tahapan denaturasi, fragmen DNA melewati tahap pre-denaturasi terlebih dahulu pada suhu 94°C selama 5 menit. Fragmen DNA baru akan memasuki tahapan denaturasi, yaitu dimana fragmen DNA dipanaskan pada suhu 94°C selama 30 detik untuk memutuskan ikatan hidrogen yang ada pada basa nitrogen DNA untai ganda (*double stranded DNA*) sehingga menjadi DNA untai tunggal (*single stranded DNA*). Tahapan PCR dilanjutkan dengan proses penempelan primer (*annealing*) pada suhu 55°C selama 30 detik. Pada tahapan ini primer akan menempel pada cetakan DNA yang bersifat komplementer dengan sekuen dari primer tersebut.. Pada tahap elongasi (*extention*), suhu akan dinaikan menjadi 72°C selama 30 detik. Pada tahap elongasi ini, enzim DNA polimerase akan mulai melakukan proses polimerasi dengan membentuk ikatan hidrogen baru antara rantai DNA yang baru dengan rantai DNA templat. Terbentuknya ikatan hidrogen baru ini akan dilengkapi dengan keberadaan basa – basa nitrogen yang berasal dari dNTPs dan terjadilah pemanjangan fragmen DNA untai ganda yang baru. Tahapan – tahapan tersebut diulangi sebanyak 40 kali (siklus) sehingga akan didapatkan amplikon DNA untai ganda yang baru dengan jumlah yang sudah ditentukan. Tahapan PCR akan dilanjutkan dengan *final extention* pada suhu 72°C selama 10 menit dengan tujuan untuk memastikan bahwa proses elongasi berjalan dengan sempurna. Tahapan terakhir pada PCR adalah tahap *hold* pada suhu 4°C dimana amplikon sekuen DNA hasil PCR dapat disimpan hingga jangka waktu yang tidak terhingga (Gambar 3.3).



Gambar 3.3. Skema Program PCR

f. Elektroforesis Hasil Amplifikasi Sekuen DNA Daerah ITS

Elektroforesis memiliki tujuan yang tidak berbeda jauh dengan elektroforesis yang dilakukan pada uji kualitatif dari DNA genom hasil ekstraksi. Perbedaannya adalah dari DNA sampel yang digunakan merupakan ampikon DNA hasil proses PCR. Pada proses elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 0,8% dalam buffer TAE 1 X sebagai pelarutnya. Gel agarosa dihomogenkan dengan dididihkan dalam *microwave* selama 1,5 menit hingga campuran terlihat bening dan homogen. Gel agarosa dicetak dengan dituangkan ke dalam cetakan gel yang sudah dipasangkan dengan sisi cetakan dengan posisi tegak. Gel agarosa dibiarkan pada suhu ruang hingga mengeras. Setelah gel agarosa mengeras, sisir sumur dilepaskan dari cetakan secara perlahan agar sumur isian terbentuk dengan baik dan tidak menghancurkan gel agarosa.

Ampikon DNA hasil proses PCR dan *ladder* disiapkan dan ditambahkan dengan menggunakan *marker* GelRed, kemudian dimasukkan ke dalam sumur isian gel agarosa yang sudah dipasang pada alat elektroforesis berisi larutan buffer TAE 1 X. Proses *running* elektroforesis dilakukan selama 30 menit dengan menggunakan daya sebesar 100 volt. Gel agarosa hasil elektroforesis lalu divisualisasi menggunakan lampu UV dan didokumentasikan (Hidayat, 2014).

g. Sekuensing DNA

Dua puluh tujuh ampikon sekuens DNA hasil amplifikasi dikirim ke Macrogen Inc., Seoul – Korea Selatan, untuk disekuensing. Sekuens DNA daerah ITS diamplifikasi menggunakan primer ITS-4 (5'-

TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAA-3') dan primer ITS-5 (5'-CCCGCCTGACCTGGGGTCGC-3') dengan menggunakan mesin ABI377A dan pewarnaan menggunakan kit ABI PRISMTM Dye Terminator.

F. Analisis Data

1. Contig

Dari hasil sekuensing yang telah dilakukan, diperoleh dua set data urutan basa nukleotida yang didapatkan dari setiap sampel hasil isolasi DNA sekuens daerah ITS. Satu set data berasal dari hasil sekuensing menggunakan primer ITS-5 dan satu set data lainnya berasal dari hasil sekuensing menggunakan primer ITS-4. Dua set data tersebut digabung (*contig*) menggunakan perangkat lunak *CodonCode Aligner* atau *ChromasPro*. Pada proses *contig*, diperoleh hasil berupa urutan sekuens DNA daerah ITS secara lengkap. Penggunaan data kedua primer tersebut adalah untuk mengurangi kemungkinan terjadinya kesalahan pada mesin *sequencer*.

2. Verifikasi Data Hasil Sekuensing

Data sekuen hasil proses *contig* selanjutnya disejajarkan dengan data DNA yang ada di *GeneBank* menggunakan program *Basic Local Alignment Sequence Tools* (BLAST) yang dilakukan secara *online* dengan alamat <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> untuk memperoleh kepastian bahwa sekuens DNA daerah ITS yang diamplifikasi merupakan benar berasal dari DNA tumbuhan terutama pisang (*Musa spp.*).

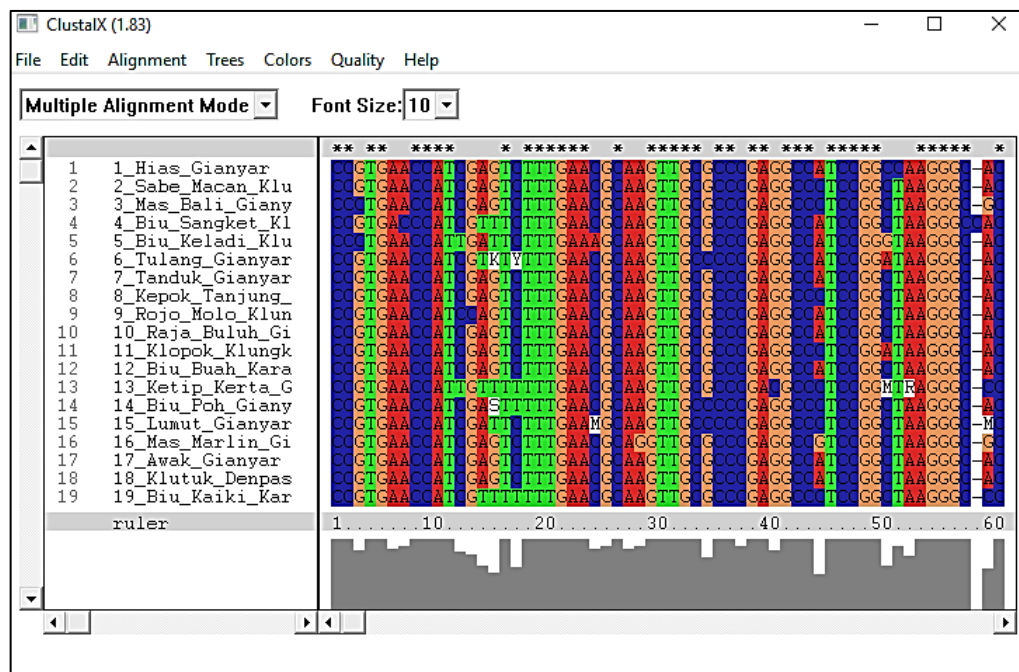
3. Pencarian Daerah ITS-2 dan Daerah 5.8S

Dalam pencarian daerah ITS - 2 dan daerah 5.8S dilakukan dengan membandingkan sekuen utuh daerah ITS dengan sekuen standar yang didapatkan dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) yang dapat diakses secara *online* melalui halaman web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Sekuen hasil *contig* dan sekuen standar selanjutnya disejajarkan (*alignment*) dengan menggunakan perangkat lunak ClustalX dengan hasil *output* berupa format nexus (.nxs) dan fasta (.fasta). Data hasil pensejajaran diproses menggunakan perangkat lunak PAUP*4.0b10 untuk memisahkan daerah sekuen mana yang termasuk ke dalam daerah ITS - 2 dan daerah 5.8S. Hasil yang didapat adalah posisi keberadaan dan urutan basa dari sekuens daerah ITS - 2 dan daerah 5.8S. Masing – masing

daerah sekuen yang didapat selanjutnya dipindahkan ke dalam berkas *Notepad* yang baru dan dibuat fasta format.

4. *Editing data*

Proses *editing data* merupakan proses yang bertujuan untuk mensejajarkan urutan basa nukleotida yang ada, membuat setiap urutan basa berada pada awal dan akhir yang bersamaan (sejajar) sehingga data menjadi informatif. Proses *alignment* dilakukan terhadap semua sekuens DNA daerah ITS - 2 dan daerah 5.8S menggunakan perangkat lunak ClustalX (Gambar 3.4). Proses *editing data* ini dilakukan sebelum pembentukan pohon filogeni.



Gambar 3.4. Proses Pensejajaran Data

5. *Pembentukan Pohon Filogenetik*

Pembentukan pohon filogenetik dilakukan terhadap data yang sudah melalui tahap *editing data* dan dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak PAUP*4.0b10, dengan memilih analisis *bootstrap* dan *Maximum Parsimony* (MP) untuk mengetahui nilai *bootstrap* (kekokohan) dari pohon filogenetik yang terbentuk.

G. Alur Penelitian

